

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



50

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C12N 15/86, 9/00, C07K 14/00, A61K
48/00

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/27070
(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum: 12. Oktober 1995 (12.10.95)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/01202
(22) Internationales Anmeldedatum: 31. März 1995 (31.03.95)

(30) Prioritätsdaten: 31. März 1994 (31.03.94) DE
P 44 11 402.8

(71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHRADER, Jürgen [DE/DE];
Meliesallee 13, D-40597 Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GÖDECKE, Axel [DE/DE];
Gänsestrasse 10, D-40593 Düsseldorf (DE).

(74) Anwälte: KOLB, Helga usw.; Hoffmann, Eitle & Partner,
Arabellastrasse 4, D-81925 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,
CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

(54) Title: DNA EXPRESSION VECTORS FOR USE IN THE TREATMENT OF VASCULAR DISEASES BY GENE THERAPY
(54) Bezeichnung: DNA-EXPRESSIONSVEKTOREN ZUR VERWENDUNG IN DER GENTHERAPEUTISCHEN BEHANDLUNG
VON GEFÄSSERKRANKUNGEN

(57) Abstract

The invention concerns a DNA expression vector which is characterized in that it comprises a DNA sequence which codes for a protein having the biological activity of nitrogen monoxide synthase (NOS). The DNA expression vector also comprises eukaryotic regulation elements which bring about the expression of said DNA sequence in eukaryotic cells. The invention further concerns the use of the expression vector for treating or preventing vascular diseases.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein DNA-Expressionsvektor beschrieben, der dadurch gekennzeichnet ist, dass er eine DNA-Sequenz, welche für ein Protein codiert, das die biologische Aktivität von Stickstoff-monoxid-synthase (NOS) besitzt, und eukaryotische Regulations-Elemente umfasst, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Elemente die Expression der genannten DNA-Sequenz in eukaryotischen Zellen bewirken, sowie die Verwendung des Expressionsvektors zur Behandlung oder Verhinderung von Gefässerkrankungen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

DNA-Expressionsvektoren zur Verwendung in der gentherapeutischen Behandlung von Gefässerkrankungen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Expressionsvektoren zur gentherapeutischen Behandlung von Gefässerkrankungen, wie Bluthochdruck, Arteriosklerose, Stenose oder Restenose.

Unter der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) versteht man ein in der Klinik weit verbreitetes Verfahren bei dem die kritische Einengung eines Herzkranzgefäßes (Koronarstenose) über einen Katheter mechanisch aufgedehnt und damit wieder durchgängig gemacht wird. Die Achillesferse der PTCA ist bis zum heutigen Tag die Restenose. Diese tritt nach Wochen bis Monaten nach erfolgreicher PTCA in 12-43% aller behandelten Patienten auf (Lange R.A. et al, Southwestern Internal Medicine Conference: Restenosis: The achilles heal of coronary angioplasty, Am.J. Med. Sci 265-274, 1993). Eine erneute PTCA oder eine Bypass-Operation ist die notwendige Folge.

Der genaue Mechanismus der Restenose ist letztlich ungeklärt. Entscheidend ist aber der initiale mechanische Dehnungsreiz bei dem es neben der Zerstörung der Endothelzellen zu Rissen in den arteriosklerotischen Wandbezirken bei gleichzeitiger Ablagerung von Fibrin und Blutplättchen kommt. Die Blutplättchen setzen ihrerseits gefäßkonstriktorische und die Proliferation steigernde Stoffwechselprodukte frei, die die wachstumshemmenden Faktoren der glatten Gefäßmuskulatur überspielen. Eine

Hyperplasie der Muskelmedia, d.h. eine Restenose ist die Folge.

Verschiedene Strategien zur Verhinderung der Restenose wurden in der Vergangenheit in klinischen Studien untersucht. Was die pharmakologische Therapie betrifft, so hatte weder der Einsatz von antithrombotischen (Aspirin, Heparin), antispastischen (Nifedipin, Diltazem), antiproliferativen (Colchizin) Mitteln noch eine Lipidspiegel sendende Therapie einen günstigen Einfluss auf die Entwicklung der Restenose. Ebenso erbrachte die Entwicklung neuer Katheter (Laser-Angioplastie, Atherektomie Katheter) zur Minimalisierung des Gewebetraumas bei der PTCA keinen Erfolg bei der Verhinderung der Restenose.

Eine Therapie die Restenose gibt es z.Z. nicht. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Wirkspiegel im Blut nach systemischer Applikation eines Pharmakons zu gering sind, um lokal therapeutisch wirksam werden zu können.

Stickstoffmonoxid (NO) wird in Säugetierzellen aus der Aminosäure L-Arginin unter Vermittlung des Enzyms NO-Synthase (NOS) gebildet. NO ist ein wichtiger Botenstoff bzw. Signalmolekül im menschlichen Körper, das eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Wirkungen vermittelt. Im zentralen Nervensystem ist NO wahrscheinlich an der Regulation von integrativen Leistungen, d.h. Gedächtnisfunktionen beteiligt. Im Gastrointestinaltrakt vermutet man eine Beteiligung an der Darmperistaltik. Das von Makrophagen gebildete NO ist in der Lage, Bakterien und Parasiten abzutöten. Innerhalb des Herz-Kreislaufsystems wird NO von den Endothelzellen gebildet, wo es mindestens zwei wichtige Funktionen ausübt. Zur luminalen Seite des Gefäßes hin hemmt es die Plättchenaggregation und ist

damit für die antithrombogene Eigenschaft der Gefäßinnenwand mitverantwortlich. An der abluminalen Seite relaxiert NO die glatte Gefäßmuskulatur und übt langfristig einen proliferationshemmenden Effekt aus. Ein Wegfall des endothelialen NO, z.B. bei Schädigung des Blutgefäßendothels, führt am Gesamtorganismus zu einem Bluthochdruck und ist wahrscheinlich auch an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt. Für die Funktion von NO ist ausserdem wichtig, dass seine biologische Halbwertszeit kürzer als eine Sekunde ist. Somit kann NO lediglich die Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft vom Bildungsort erreichen, d.h. die Wirkung von NO ist lokal beschränkt.

Zur Familie der NOS gehören mindestens drei verschiedene NOS Isoenzyme: das endotheliale Enzym (eNOS), das Gehirn-Enzym (bNOS) und die induzierbare NOS (iNOS). Alle drei Isoenzyme sind inzwischen isoliert, ihre Primärstruktur, d.h. Aminosäuresequenz aufgeklärt und die kodierenden Genabschnitte charakterisiert. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen NOS liegt in ihrem Molekulargewicht und vor allem in der Regulation der Expression und der enzymatischen Aktivität. So werden die eNOS und bNOS über ihre Aktivität und die iNOS vorzugsweise über die Expression reguliert.

Zur Charakterisierung der NOS-Enzyme wird folgendes erläutert:

eNOS: Dieses Isoenzym hat ein Molekulargewicht von 133 kDa, hat eine Bindungsstelle für Calmodulin, die abhängig ist von der freien Ca^{++} -Konzentration und liegt zu mehr als 90% membrangebunden vor.

bNOS: das Hirn-Enzym ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 160 kDa pro Untereinheit, das zu

weniger als 10% membrangebunden vorliegt. Wie bei der eNOS ist die Calmodulin-Bindung abhängig vom freien Ca^{++} , d.h. beide Enzyme werden nur aktiv, wenn die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration, z.B. infolge eines rezeptorvermittelten Ca^{++} -Einstroms, erhöht ist.

iNOS: die induzierbare NOS ist ebenfalls ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 130 kDa pro Untereinheit. Der wesentliche Unterschied zu den anderen Isoenzymen ist, dass die Aktivität der iNOS unabhängig von Calmodulin und damit unabhängig vom zellulären Calcium ist. Weil die Umsatzgeschwindigkeit für L-Arginin für die iNOS etwa 10-100 mal höher ist als bei der eNOS oder bNOS, wird die iNOS auch als "high output" NOS bezeichnet. Die iNOS lässt sich unter basalen Bedingungen normalerweise nicht nachweisen; sie wird jedoch nach immunologischer Aktivierung durch Entzündungsmediatoren und Endotoxine stark exprimiert.

Aufgabe der Erfindung ist es, einen Expressionsvektor zur Verfügung zu stellen, welcher geeignet ist, zur gentherapeutischen Behandlung von Gefäßerkrankungen, insbesondere Bluthochdruck oder Arteriosklerose, Stenose oder Restenose.

Die vorstehende Aufgabe wird gelöst durch einen DNA-Expressionsvektor, der aus einer DNA-Sequenz, welche für ein Protein codiert, das die biologische Aktivität von Stickstoff-monoxid-synthase beinhaltet, und aus eukaryotischen Regulations-Elementen besteht, wobei die mit diesem DNA-Expressionsvektor transformierten oder infizierten Blutgefäße rekombinante Stickstoff-monoxid-synthase in einer therapeutisch annehmbaren Menge zur Hemmung von Stenose oder Restenose der genannten

Blutgefäße und/oder zur Hemmung der Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur exprimieren.

Der vorstehende Expressionsvektor findet gemäss der Erfindung Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Gefässerkrankungen, insbesondere Bluthochdruck, Arteriosklerose oder Stenose, und insbesondere für Restenose der karonaren Herzkranzgefäße nach perkutaner, transluminaler koronarer Angioplastie.

Im weiteren wird eine pharmazeutischen Zusammensetzung zur Verfügung gestellt.

Die Erfinder haben überraschenderweise gefunden, dass die Expression von rekombinanter Stickstoff-monoxid-synthase in Blutgefässen, die mit einem hier beschriebenen DNA-Expressionsvektor transfiziert wurden, zu einer therapeutisch relevanten Hemmung der Gefäß-Stenose und Restenose nach perkutaner, transluminaler, koronarer Angioplastie führt.

Die Erfindung bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, vorzugsweise eine cDNA-Sequenz, die erhalten wird von Säugern, vorzugsweise von Mäusen oder Menschen, welche für iNOS-, bNOS- oder eNOS-, vorzugsweise iNOS-Aktivität codiert. Bevorzugt wird die iNOS cDNA eingesetzt, da sie eine höhere spezifische Aktivität hat, die darüber hinaus Ca-unabhängig ist. Die Enzymaktivität ist daher unabhängig von regulatorischen Einflüssen.

Der DNA-Expressionsvektor kann ein Sequenzelement, das die Replikation in Bakterien ermöglicht, ein Sequenzelement, das die Replikation des genannten Vektors in eukaryotischen Zellen ermöglicht, vorzugsweise das SV40 Replikations-

Sequenzelement, ein Polyadenylierungs-Signal und ein oder mehrere Introns umfassen.

Das Regulationselement kann den Promotor und/oder die Enhancer-Region von eukaryotischen Viren, vorzugsweise von Cytomegalovirus oder Adenovirus, und mehr bevorzugt den Promotor-Enhancer des Cytomegalovirus Immediate-Early Polypeptid-Gens, umfassen.

Ausserdem bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die Behandlung und Verhinderung von Gefässerkrankungen beim Menschen, wie Bluthochdruck und Arteriosklerose sowie Stenose oder Restenose der Blutgefässe. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung und Vorbeugung von Restenose der Herzgefässe nach perkutaner, transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA), wobei die Blutgefässe mit dem oben beschriebenen DNA-Expressionsvektor in Kontakt gebracht, transfiziert oder infiziert werden .

Die Transfizierung oder Infizierung der Blutgefässe mit einem DNA-Expressionsvektor kann durch jede im Stand der Technik bekannte Standardmethode erfolgen und ist nicht auf die hier beschriebene Transfizierungstechnik beschränkt.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die diesen DNA-Expressionsvektor zur Behandlung oder Verhinderung der oben genannten Gefässerkrankungen umfasst. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zusätzlich zu dem DNA-Expressionsvektor einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, ein Stabilisierungsmittel oder Puffer umfassen.

Die nachfolgenden Figuren dienen der Erläuterung der Erfindung.

- Fig.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenz der induzierbaren NO-Synthase der Maus (Mus musculus/Mammalia) abgeleitet aus der clonierten cDNA, Genbank Accession No.: M92649);
- Fig.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenz der neuronalen NO-Synthase des Menschen (Homo sapiens/Mammalia) aus der clonierten cDNA, Genbank Accession No.:L02881);
- Fig.3 Nukleotid- und Aminosäuresequenz der endothelialen NO-Synthase des Rindes (Bos taurus/Mammalia) abgeleitet aus der clonierten cDNA, Genbank Accession No.: M95674;
- Fig.4a das 2,17 Kb CMV-Promotor enthaltende PvuI-PvuII-Fragment, das zum weiteren Aufbau des Plasmids pSCMV aus dem Plasmid pSP65h-CMV isoliert wurde;
- Fig.4b das die 2,80 Kb 3'-Region des β -Globin-Gens und den SV40 Replikationsursprung enthaltende PvuI-PvuII-Fragment, das zum weiteren Aufbau des Plasmids pCMV aus dem Plasmid pSCT GAL X-556 isoliert wurde;
- Fig.4c das Plasmid pSCMV;
- Fig.4d das 3,97Kb iNOS-enthaltende HindIII-XhoI-Fragment gemäss Fig. 1;
- Fig.4e das Plasmid pSCMV-iNOS.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie jedoch darauf zu beschränken.

Beispiel 1

I. Elemente eines Expressionsvektors

Das Expressionsplasmid pSCMV-iNOS wurde auf der Basis des Plasmids pSO65 (Promega Biotech) cloniert. Es enthält die folgenden funktionellen Elemente:

- Promotor/Enhancer des humanen Cytomegalovirus Immediate-Early-Polypeptids (Pos. 216-809 /Genbank Accession No.: K03104)
- cDNA der induzierbaren NO-Synthase der Maus (Pos. 127-4110/Genbank Accession No.: M92649)
- genomische Sequenzen des ss-Globin-Gens des Kaninchens (Pos. 905-2080), die das Intron 2, das Exon 3 und das Polyadenylierungssignal enthalten (Pos. 905-1827 sind unter Genbank Accession No.: J00659 abgespeichert).
- den Replikationsursprung des SV40-Virus (Pos. 130 [SV40 early map] bzw. Pos. 5176- 130 der zirkulären SV40 Karte/Genbank Accession No.: V01380).

II. Herstellung eines Expressionsvektors:

Der CMV-Promotor/Enhancer lag als DNA-Fragment mit stumpfen Enden in die SmaI-Stelle des Plasmids pSP65 inseriert vor (pSP65 h-CMV1) Aus diesem Plasmid wurde das PvuI-PvuII-Fragment isoliert (Fig.4a), das den CMV-Promotor trägt.

Aus dem Plasmid PSCT GAL.X-556 (siehe Fig. 4b) wurde ein PvuII-PvuI-Fragment isoliert, das die 3'-Region des ss-Globin-Gens und den SV40 Replikationsursprung trägt (Fig.4b). Dieses Fragment wurde mit dem PvuII-PvuI-Fragment

aus pSP65h-CMV1 ligiert. An dem resultierenden Plasmid (pSCMV, Fig. 4c) wurden folgende Veränderungen vorgenommen:

- Deletion der Vektorsequenzen zwischen HindIII und PvuII bei gleichzeitiger Insertion eines ClaI-Linkers. Dadurch gehen die Ausgangsschnittstellen PvuII und HindIII verloren.
- Umwandlung der XhoI-Schnittstelle in eine PvuI-Schnittstelle.

Der erhaltene Vektor wurde als pSCMV2 bezeichnet.

Die iNOS-cDNA wurde als HindII-XhoI-Fragment (Fig.4d) in den XbaI-SaII verdauten Vektor pSCMV2 cloniert. Dazu wurden die 5'-überhängenden Enden nach der XbaI-Verdauung durch Auffüllen in glatte Enden umgewandelt. Am 3'-Ende wurde die cDNA mit dem Intron und dem Polyadenylierungssignal des ss-Globin-Gens aus dem Huhn fusioniert. Die Funktionalität des Konstrukts wurde durch Transfektion von COS-Zellen und anschliessendem Nachweis der Enzymaktivität überprüft. Das resultierende Plasmid pSCMV-iNOS (Fig.4e) wurde für die Transfektionsexperimente eingesetzt. Der CMV-Promotor vermittelt eine konstitutive Expression des iNOS-Gens. Die Aktivität des gebildeten Enzyms ist Ca-unabhängig.

III. Herstellung von DNA-Liposomenkomplexen

Die Anzucht von Sendai-Viren erfolgte in der Chorion-allantis-Flüssigkeit befruchteter Hühnereier (dl0-dl2 der Embryonalentwicklung) nach Standardverfahren (Nakanishi M., Uchida T., Sugawa H., Ishiura M., Okada Y., Exp. Cell. Res. 159, 399-409).

Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Cholesterin wurden in Tetrahydrofuran gelöst, im molaren Verhältnis von 4.8:1:2 gemischt und unter Stickstoff evaporiert. 10 mg der getrockneten Lipide wurden durch Vortexen in 200 µl pSCMV-iNOS [gelöst in BSS (140 mM NaCl, 5.4 mM KCl und 10 mM Tris-HCl, pH7.69)] (Konz. 1 µg/µl) suspendiert. Die erhaltenen Liposomen wurden mit 4 ml Sendai-Virus (Z-Stamm) (16000 Hämagglutinations-Einheiten (HAU)/ml) 3h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschliessend für 20" im Ultraschallbad beschallt. Die Viren wurden vor der Verwendung mit UV-Licht inaktiviert (11 J/m² x s). Die erhaltene Suspension wurde auf zwei Saccharose-Gradienten (1 ml 60%, 1 ml 40%, 8 ml 30% Saccharose in BSS) geladen und für 3 h bei 30.000 UpM im SW40-Rotor (Beckman Instruments) bei 4°C zentrifugiert. Die oberen 2 ml wurden abgenommen und für die Transfektionsexperimente eingesetzt.

IV. Transfektions-Protokoll

Zur Untersuchung des Effekts einer lokalen Überexpression der iNOS auf die Proliferation der glatten Gefässmuskulatur nach Endothelschädigung in vivo wurde das von Clowes AW, Reidy MA und Clowes (MM Lab. Invest 49, 327-333, 1983) etablierte Restenose-Modell der Ratte benutzt. Im Bereich des Halses wurde die Arteria carotis communis dargestellt sowie die rostral gelegene Bifurkation, an der sich die A. carotis communis in die A. carotis externa und A. carotis interna aufspaltet. Die A. carotis externa wurde etwa 1 cm rostral von der Bifurkation permanent, die A. carotis interna durch eine Gefässklemme vorübergehend unterbunden. Die A. carotis externa wurde durch einen Schnitt etwa 0.5 cm rostral von der Bifurkation geöffnet. Über diese Öffnung wurde ein Fogarty 2F Embolektomie-Katheter in die A. carotis communis eingeführt, und das Endothel der A.

carotis communis wurde durch drei Passagen des dilatierten Katheters entfernt.

Für die "Therapiegruppe" wurde das folgende Verfahren angewendet. Das denudierte Gefäss wurde nach Entfernen des Katheters 1.5 bis 2 cm caudal von der Bifurkation mit einer Gefässklemme verschlossen. Von der Öffnung in der A. carotis externa wurde ein Polyethylen-Katheter in das Gefäss eingebunden. Über diesen Katheter wurden 50-100 µl einer Lösung mit DNA-Liposomen-Komplexen innerhalb 15-20 min. in den isolierten Abschnitt der A. carotis communis injiziert. Es wurde darauf geachtet, dass der Gefässabschnitt während der Transfektion durch die Liposomenlösung unter Druck stand. Nach Entfernen des Transfektionkatheters wurde die A. carotis externa caudal des Gefässschnittes permanent unterbunden und anschliessend der Blutfluss durch Entfernen der Gefässklemmen über die A. carotis communis und A. carotis interna wieder hergestellt.

V. Morphologische Analyse der Gefässe

Ratten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (bis 21d) nach Transfektion der A. carotis communis auf die morphologischen Veränderungen in den Gefässen hin untersucht. Die Gefässe wurden durch Perfusion mit 3% Paraformaldehyd in PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat, pH 7.5) fixiert und geschnitten. Das Ausmass der Proliferation wurde mit kontrollbehandelten Gefässen verglichen. Es zeigte sich eine Reduktion der Stenose-Bildung um bis zu 60% bei den behandelten Tieren. Diese Studie zeigt erstmals, dass in diesem Tiermodell die lokale Überexpression eines Gens eine therapierelevante Hemmung der Gefässstenose zur Folge hat und demonstriert die besondere Rolle von NO für die Hemmung der Proliferation der glatten Gefässmuskulatur.

Patentansprüche

1. DNA-Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, dass er eine DNA-Sequenz, welche für ein Protein codiert, das die biologische Aktivität von Stickstoff-monoxid-synthase (NOS) besitzt, und eukaryotische Regulations-Elemente umfasst, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Expressions-Elemente die Expression der genannten DNA-Sequenz in eukaryotischen Zellen bewirken.
2. DNA-Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, dass er eine cDNA-Sequenz, welche für ein Protein codiert, das die biologische Aktivität von Stickstoff-monoxid-synthase (NOS) besitzt, und eukaryotische Regulations-Elemente umfasst, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Expressions-Elemente die Expression der genannten cDNA-Sequenz in eukaryotischen Zellen bewirken.
3. DNA-Expressionsvektor nach Anspruch 1 oder 2, wobei die genannte DNA- oder cDNA-Sequenz von Säugern abgeleitet ist.
4. DNA-Expressionsvektor nach Anspruch 3, wobei die DNA- oder cDNA-Sequenz eine humane DNA- oder cDNA-Sequenz darstellt.
5. DNA-Expressionsvektor nach einem oder mehreren der vorangehenden Ansprüche, wobei die cDNA die Nukleotidsequenz von Stickstoff-monoxid-synthase gemäss Fig. 1, Fig. 2 oder Fig. 3 umfasst, oder die Aminosäuresequenz von Stickstoff-monoxid-synthase gemäss Fig. 1, Fig. 2 oder Fig. 3 codiert.

6. DNA-Expressionsvektor nach einem oder mehreren der vorangehenden Ansprüche, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Elemente von einem eukaryotischen Virus abgeleitet sind.
7. DNA-Expressionsvektor nach einem oder mehreren der vorangehenden Ansprüche, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Elemente von dem Cytomegalovirus (CMV)-Promotor und/oder Enhancer der frühen Gene abgeleitet ist.
8. DNA-Expressionsvektor nach Anspruch 6, wobei der genannte DNA-Expressionsvektor pSCMV-iNOS gemäss Fig. 4e darstellt.
9. DNA-Expressionsvektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei die genannten eukaryotischen Regulations-Elemente von einem Adenovirus-Promotor und/oder -Enhancer-Element abgeleitet sind.
10. Pharmazeutisches Mittel, dadurch gekennzeichnet, dass es einen DNA-Expressionsvektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.
11. Verwendung des DNA-Expressionsvektors nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 bzw. des pharmazeutischen Mittels nach Anspruch 10 zur Behandlung oder Verhinderung von Gefässerkrankungen, Bluthochdruck oder Arteriosklerose, Stenose oder Restenose der Blutgefässe.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei es sich bei der Restenose um eine Restenose der Herzkranzgefässe nach

perkutaner transluminaler Koronar-Angioplastie (PTCA)
handelt.

1/23
Figur. 1

GAGACTCTGG	CCCCACGGGA	CACAGTGTCA	CTGGTTTGAA	ACTTCTCAGC	CACCTTGGTG	60
AAGGGACTGA	GCTGTTAGAG	ACACTTCTGA	GGCTCCTCAC	GCTTGGGTCT	TGTTCACTCC	120
ACGGAGTAGC	CTAGTCAACT	GCAAGAGAAC	GGAGAACGTT	GGATTTGGAG	CAGAAGTGCA	180
AAGTCTCAGA	C ATG GCT TGC CCC TGG AAG TTT CTC TTC AAA GTC AAA TCC	230				
	Met Ala Cys Pro Trp Lys Phe Leu Phe Lys Val Lys Ser					
	1 5 10					
TAC CAA AGT GAC CTG AAA GAG GAA AAG GAC ATT AAC AAC AAC GTG AAG	278					
Tyr Gln Ser Asp Leu Lys Glu Glu Lys Asp Ile Asn Asn Asn Val Lys						
15 20 25						
AAA ACC CCT TGT GCT GTT CTC AGC CCA ACA ATA CAA GAT GAC CCT AAG	326					
Lys Thr Pro Cys Ala Val Leu Ser Pro Thr Ile Gln Asp Asp Pro Lys						
30 35 40 45						
AGT CAC CAA AAT GGC TCC CCG CAG CTC CTC ACT GGG ACA GCA CAG AAT	374					
Ser His Gln Asn Gly Ser Pro Gln Leu Leu Thr Gly Thr Ala Gln Asn						
50 55 60						
GTT CCA GAA TCC CTG GAC AAG CTG CAT GTG ACA TCG ACC CGT CCA CAG	422					
Val Pro Glu Ser Leu Asp Lys Leu His Val Thr Ser Thr Arg Pro Gln						
65 70 75						
TAT GTG AGG ATC AAA AAC TGG GGC AGT GGA GAG ATT TTG CAT GAC ACT	470					
Tyr Val Arg Ile Lys Asn Trp Gly Ser Gly Glu Ile Leu His Asp Thr						
80 85 90						
CTT CAC CAC AAG GCC ACA TCG GAT TTC ACT TGC AAG TCC AAG TCT TGC	518					
Leu His His Lys Ala Thr Ser Asp Phe Thr Cys Lys Ser Lys Ser Cys						
95 100 105						
TTG GGG TCC ATC ATG AAC CCC AAG AGT TTG ACC AGA GGA CCC AGA GAC	566					
Leu Gly Ser Ile Met Asn Pro Lys Ser Leu Thr Arg Gly Pro Arg Asp						
110 115 120 125						
AAG CCT ACC CCT CTG GAG GAG CTC CTG CCT CAT GCC ATT GAG TTC ATC	614					
Lys Pro Thr Pro Leu Glu Glu Leu Leu Pro His Ala Ile Glu Phe Ile						
130 135 140						
AAC CAG TAT TAT GGC TCC TTT AAA GAG GCA AAA ATA GAG GAA CAT CTG	662					
Asn Gln Tyr Tyr Gly Ser Phe Lys Glu Ala Lys Ile Glu Glu His Leu						
145 150 155						
GCC AGG CTG GAA GCT GTA ACA AAG GAA ATA GAA ACA ACA GGA ACC TAC	710					
Ala Arg Leu Glu Ala Val Thr Lys Glu Ile Glu Thr Thr Gly Thr Tyr						
160 165 170						
CAG CTC ACT CTG GAT GAG CTC ATC TTT GCC ACC AAG ATG GCC TGG AGG	758					
Gln Leu Thr Leu Asp Glu Leu Ile Phe Ala Thr Lys Met Ala Trp Arg						
175 180 185						
AAT GCC CCT CGC TGC ATC GGC AGG ATC CAG TGG TCC AAC CTG CAG GTC	806					
Asn Ala Pro Arg Cys Ile Gly Arg Ile Gln Trp Ser Asn Leu Gln Val						
190 195 200 205						
TTT GAC GCT CGG AAC TGT AGC ACA GCA CAG GAA ATG TTT CAG CAC ATC	854					
Phe Asp Ala Arg Asn Cys Ser Thr Ala Gln Glu Met Phe Gln His Ile						
210 215 220						

TGC AGA CAC ATA CTT TAT GCC ACC AAC AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC	902
Cys Arg His Ile Leu Tyr Ala Thr Asn Asn Gly Asn Ile Arg Ser Ala	
225 230 235	
ATC ACT GTG TTC CCC CAG CGG AGT GAC GGC AAA CAT GAC TTC AGG CTC	950
Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Ser Asp Gly Lys His Asp Phe Arg Leu	
240 245 250	
TGG AAT TCA CAG CTC ATC CGG TAC GCT GGC TAC CAG ATG CCC GAT GGC	998
Trp Asn Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Ala Gly Tyr Gln Met Pro Asp Gly	
255 260 265	
ACC ATC AGA GGG GAT GCT GCC ACC TTG GAG TTC ACC CAG TTG TGC ATC	1046
Thr Ile Arg Gly Asp Ala Ala Thr Leu Glu Phe Thr Gln Leu Cys Ile	
270 275 280 285	
GAC CTA GGC TGG AAG CCC CGC TAT GGC CGC TTT GAT GTG CTG CCT CTG	1094
Asp Leu Gly Trp Lys Pro Arg Tyr Gly Arg Phe Asp Val Leu Pro Leu	
290 295 300	
GTC TTG CAA GCT GAT GGT CAA GAT CCA GAG GTC TTT GAA ATC CCT CCT	1142
Val Leu Gln Ala Asp Gly Gln Asp Pro Glu Val Phe Glu Ile Pro Pro	
305 310 315	
GAT CTT GTG TTG GAG GTG ACC ATG GAG CAT CCC AAG TAC GAG TGG TTC	1190
Asp Leu Val Leu Glu Val Thr Met Glu His Pro Lys Tyr Glu Trp Phe	
320 325 330	
CAG GAG CTC GGG TTG AAG TGG TAT GCA CTG CCT GCC GTG GCC AAC ATG	1238
Gln Glu Leu Gly Leu Lys Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val Ala Asn Met	
335 340 345	
CTA CTG GAG GTG GGT GGC CTC GAA TTC CCA GCC TGC CCC TTC AAT GGT	1286
Leu Leu Glu Val Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Cys Pro Phe Asn Gly	
350 355 360 365	
TGG TAC ATG GGC ACC GAG ATT GGA GTT CGA GAC TTC TGT GAC ACA CAG	1334
Trp Tyr Met Gly Thr Glu Ile Gly Val Arg Asp Phe Cys Asp Thr Gln	
370 375 380	
CGC TAC AAC ATC CTG GAG GAA GTG GGC CGA AGG ATG GGC CTG GAG ACC	1382
Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Glu Val Gly Arg Arg Met Gly Leu Glu Thr	
385 390 395	
CAC ACA CTG GCC TCC CTC TGG AAA GAC CGG GCT GTC ACG GAG ATC AAT	1430
His Thr Leu Ala Ser Leu Trp Lys Asp Arg Ala Val Thr Glu Ile Asn	
400 405 410	
GTG GCT GTG CTC CAT AGT TTC CAG AAG CAG AAT GTG ACC ATC ATG GAC	1478
Val Ala Val Leu His Ser Phe Gln Lys Gln Asn Val Thr Ile Met Asp	
415 420 425	
CAC CAC ACA GCC TCA GAG TCC TTC ATG AAG CAC ATG CAG AAT GAG TAC	1526
His His Thr Ala Ser Glu Ser Phe Met Lys His Met Gln Asn Glu Tyr	
430 435 440 445	
CGG GCC CGT GGA GGC TGC CCG GCA GAC TGG ATT TGG CTG GTC CCT CCA	1574
Arg Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ile Trp Leu Val Pro Pro	
450 455 460	
GTG TCT GGG AGC ATC ACC CCT GTG TTC CAC CAG GAG ATG TTG AAC TAT	1622
Val Ser Gly Ser Ile Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met Leu Asn Tyr	
465 470 475	

3/23

GTC	CTA	TCT	CCA	TTC	TAC	TAC	TAC	CAG	ATC	GAG	CCC	TGG	AAG	ACC	CAC	1670
Val	Leu	Ser	Pro	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Gln	Ile	Glu	Pro	Trp	Lys	Thr	His	
		480					485					490				
ATC	TGG	CAG	AAT	GAG	AAG	CTG	AGG	CCC	AGG	AGG	AGA	GAG	ATC	CGA	TTT	1718
Ile	Trp	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Arg	Pro	Arg	Arg	Arg	Glu	Ile	Arg	Phe	
	495					500					505					
AGA	GTC	TTG	GTG	AAA	GTG	GTG	TTC	TTT	GCT	TCC	ATG	CTA	ATG	CGA	AAG	1766
Arg	Val	Leu	Val	Lys	Val	Val	Phe	Phe	Ala	Ser	Met	Leu	Met	Arg	Lys	
510					515					520					525	
GTC	ATG	GCT	TCA	CGG	GTC	AGA	GCC	ACA	GTC	CTC	TTT	GCT	ACT	GAG	ACA	1814
Val	Met	Ala	Ser	Arg	Val	Arg	Ala	Thr	Val	Leu	Phe	Ala	Thr	Glu	Thr	
				530					535					540		
GGG	AAG	TCT	GAA	GCA	CTA	GCC	AGG	GAC	CTG	GCC	ACC	TTG	TTC	AGC	TAC	1862
Gly	Lys	Ser	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Asp	Leu	Ala	Thr	Leu	Phe	Ser	Tyr	
			545					550						555		
GCC	TTC	AAC	ACC	AAG	GTT	GTC	TGC	ATG	GAC	CAG	TAT	AAG	GCA	AGC	ACC	1910
Ala	Phe	Asn	Thr	Lys	Val	Val	Cys	Met	Asp	Gln	Tyr	Lys	Ala	Ser	Thr	
		560					565					570				
TTG	GAA	GAG	GAG	CAA	CTA	CTG	CTG	GTG	GTG	ACA	AGC	ACA	TTT	GGG	AAT	1958
Leu	Glu	Glu	Glu	Gln	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Ser	Thr	Phe	Gly	Asn	
	575					580					585					
GGA	GAC	TGT	CCC	AGC	AAT	GGG	CAG	ACT	CTG	AAG	AAA	TCT	CTG	TTC	ATG	2006
Gly	Asp	Cys	Pro	Ser	Asn	Gly	Gln	Thr	Leu	Lys	Lys	Ser	Leu	Phe	Met	
590					595					600					605	
CTT	AGA	GAA	CTC	AAC	CAC	ACC	TTC	AGG	TAT	GCT	GTG	TTT	GGC	CTT	GGC	2054
Leu	Arg	Glu	Leu	Asn	His	Thr	Phe	Arg	Tyr	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	
				610					615					620		
TCC	AGC	ATG	TAC	CCT	CAG	TTC	TGC	GCC	TTT	GCT	CAT	GAC	ATC	GAC	CAG	2102
Ser	Ser	Met	Tyr	Pro	Gln	Phe	Cys	Ala	Phe	Ala	His	Asp	Ile	Asp	Gln	
			625					630					635			
AAG	CTG	TCC	CAC	CTG	GGA	GCC	TCT	CAG	CTT	GCC	CCA	ACA	GGA	GAA	GGG	2150
Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gly	Ala	Ser	Gln	Leu	Ala	Pro	Thr	Gly	Glu	Gly	
		640					645					650				
GAC	GAA	CTC	AGT	GGG	CAG	GAG	GAT	GCC	TTC	CGC	AGC	TGG	GCT	GTA	CAA	2198
Asp	Glu	Leu	Ser	Gly	Gln	Glu	Asp	Ala	Phe	Arg	Ser	Trp	Ala	Val	Gln	
	655					660					665					
ACC	TTC	CGG	GCA	GCC	TGT	GAG	ACC	TTT	GAT	GTC	CGA	AGC	AAA	CAT	CAC	2246
Thr	Phe	Arg	Ala	Ala	Cys	Glu	Thr	Phe	Asp	Val	Arg	Ser	Lys	His	His	
670					675					680					685	
ATT	CAG	ATC	CCG	AAA	CGC	TTC	ACT	TCC	AAT	GCA	ACA	TGG	GAG	CCA	CAG	2294
Ile	Gln	Ile	Pro	Lys	Arg	Phe	Thr	Ser	Asn	Ala	Thr	Trp	Glu	Pro	Gln	
				690					695					700		
CAA	TAT	AGG	CTC	ATC	CAG	AGC	CCG	GAG	CCT	TTA	GAC	CTC	AAC	AGA	GCC	2342
Gln	Tyr	Arg	Leu	Ile	Gln	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu	Asp	Leu	Asn	Arg	Ala	
			705					710					715			

CTC	AGC	AGC	ATC	CAT	GCA	AAG	AAC	GTG	TTT	ACC	ATG	AGG	CTG	AAA	TCC	2390
Leu	Ser	Ser	Ile	His	Ala	Lys	Asn	Val	Phe	Thr	Met	Arg	Leu	Lys	Ser	
		720					725					730				
CAG	CAG	AAT	CTG	CAG	AGT	GAA	AAG	TCC	AGC	CGC	ACC	ACC	CTC	CTC	GTT	2438
Gln	Gln	Asn	Leu	Gln	Ser	Glu	Lys	Ser	Ser	Arg	Thr	Thr	Leu	Leu	Val	
		735					740					745				
CAG	CTC	ACC	TTC	GAG	GGC	AGC	CGA	GGG	CCC	AGC	TAC	CTG	CCT	GGG	GAA	2486
Gln	Leu	Thr	Phe	Glu	Gly	Ser	Arg	Gly	Pro	Ser	Tyr	Leu	Pro	Gly	Glu	
		750			755					760					765	
CAC	CTG	GGG	ATC	TTC	CCA	GGC	AAC	CAG	ACC	GCC	CTG	GTG	CAG	GGA	ATC	2534
His	Leu	Gly	Ile	Phe	Pro	Gly	Asn	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Gln	Gly	Ile	
				770					775						780	
TTG	GAG	CGA	GTT	GTG	GAT	TGT	CCT	ACA	CCA	CAC	CAA	ACT	GTG	TGC	CTG	2582
Leu	Glu	Arg	Val	Val	Asp	Cys	Pro	Thr	Pro	His	Gln	Thr	Val	Cys	Leu	
			785					790						795		
GAG	GTT	CTG	GAT	GAG	AGC	GGC	AGC	TAC	TGG	GTC	AAA	GAC	AAG	AGG	CTG	2630
Glu	Val	Leu	Asp	Glu	Ser	Gly	Ser	Tyr	Trp	Val	Lys	Asp	Lys	Arg	Leu	
		800					805					810				
CCC	CCC	TGC	TCA	CTC	AGC	CAA	GCC	CTC	ACC	TAC	TTC	CTG	GAC	ATT	ACG	2678
Pro	Pro	Cys	Ser	Leu	Ser	Gln	Ala	Leu	Thr	Tyr	Phe	Leu	Asp	Ile	Thr	
		815					820				825					
ACC	CCT	CCC	ACC	CAG	CTG	CAG	CTC	CAC	AAG	CTG	GCT	CGC	TTT	GCC	ACG	2726
Thr	Pro	Pro	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	His	Lys	Leu	Ala	Arg	Phe	Ala	Thr	
					835					840					845	
GAC	GAG	ACG	GAT	AGG	CAG	AGA	TTG	GAG	GCC	TTG	TGT	CAG	CCC	TCA	GAG	2774
Asp	Glu	Thr	Asp	Arg	Gln	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Cys	Gln	Pro	Ser	Glu	
				850					855					860		
TAC	AAT	GAC	TGG	AAG	TTC	AGC	AAC	AAC	CCC	ACG	TTC	CTG	GAG	GTG	CTT	2822
Tyr	Asn	Asp	Trp	Lys	Phe	Ser	Asn	Asn	Pro	Thr	Phe	Leu	Glu	Val	Leu	
			865					870					875			
GAA	GAG	TTC	CCT	TCC	TTG	CAT	GTG	CCC	GCT	GCC	TTC	CTG	CTG	TCG	CAG	2870
Glu	Glu	Phe	Pro	Ser	Leu	His	Val	Pro	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Ser	Gln	
		880					885					890				
CTC	CCT	ATC	TTG	AAG	CCC	CGC	TAC	TAC	TCC	ATC	AGC	TCC	TCC	CAG	GAC	2918
Leu	Pro	Ile	Leu	Lys	Pro	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	
		895				900					905					
CAC	ACC	CCC	TCG	GAG	GTT	CAC	CTC	ACT	GTG	GCC	GTG	GTC	ACC	TAC	CGC	2966
His	Thr	Pro	Ser	Glu	Val	His	Leu	Thr	Val	Ala	Val	Val	Thr	Tyr	Arg	
					915					920					925	
ACC	CGA	GAT	GGT	CAG	GGT	CCC	CTG	CAC	CAT	GGT	GTC	TGC	AGC	ACT	TGG	3014
Thr	Arg	Asp	Gly	Gln	Gly	Pro	Leu	His	His	Gly	Val	Cys	Ser	Thr	Trp	
					930				935					940		
ATC	AGG	AAC	CTG	AAG	CCC	CAG	GAC	CCA	GTG	CCC	TGC	TTT	GTG	CGA	AGT	3062
Ile	Arg	Asn	Leu	Lys	Pro	Gln	Asp	Pro	Val	Pro	Cys	Phe	Val	Arg	Ser	
			945					950					955			
GTC	AGT	GGC	TTC	CAG	CTC	CCT	GAG	GAC	CCC	TCC	CAG	CCT	TGC	ATC	CTC	3110
Val	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Pro	Glu	Asp	Pro	Ser	Gln	Pro	Cys	Ile	Leu	
		960					965						970			

5/23

ATT GGG CCT GGT ACG GGC ATT GCT CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG Ile Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Ser Phe Trp Gln Gln 975 980 985	3158
CGG CTC CAT GAC TCC CAG CAC AAA GGG CTC AAA GGA GGC CGC ATG AGC Arg Leu His Asp Ser Gln His Lys Gly Leu Lys Gly Gly Arg Met Ser 990 995 1000 1005	3206
TTG GTG TTT GGG TGC CGG CAC CCG GAG GAG GAC CAC CTC TAT CAG GAA Leu Val Phe Gly Cys Arg His Pro Glu Glu Asp His Leu Tyr Gln Glu 1010 1015 1020	3254
GAA ATG CAG GAG ATG GTC CGC AAG AGA GTG CTG TTC CAG GTG CAC ACA Glu Met Gln Glu Met Val Arg Lys Arg Val Leu Phe Gln Val His Thr 1025 1030 1035	3302
GGC TAC TCC CGG CTG CCC GGC AAA CCC AAG GTC TAC GTT CAG GAC ATC Gly Tyr Ser Arg Leu Pro Gly Lys Pro Lys Val Tyr Val Gln Asp Ile 1040 1045 1050	3350
GTG CAA AAG CAG CTG GCC AAT GAG GTA CTC AGC GTG CTC CAC GGG GAG Leu Gln Lys Gln Leu Ala Asn Glu Val Leu Ser Val Leu His Gly Glu 1055 1060 1065	3398
CAG GGC CAC CTC TAC ATT TGC GGA GAT GTG CGC ATG GCT CGG GAT GTG Gln Gly His Leu Tyr Ile Cys Gly Asp Val Arg Met Ala Arg Asp Val 1070 1075 1080 1085	3446
GCT ACC ACA TTG AAG AAG CTG GTG GCC ACC AAG CTG AAC TTG AGC GAG Ala Thr Thr Leu Lys Lys Leu Val Ala Thr Lys Leu Asn Leu Ser Glu 1090 1095 1100	3494
GAG CAG GTG GAA GAC TAT TTC TTC CAG CTC AAG AGC CAG AAA CGT TAT Glu Gln Val Glu Asp Tyr Phe Phe Gln Leu Lys Ser Gln Lys Arg Tyr 1105 1110 1115	3542
CAT GAA GAT ATC TTC GGT GCA GTC TTT TCC TAT GGG GCA AAA AAG GGC His Glu Asp Ile Phe Gly Ala Val Phe Ser Tyr Gly Ala Lys Lys Gly 1120 1125 1130	3590
AGC GCC TTG GAG GAG CCC AAA GCC ACG AGG CTC TGACAGCCCA GAGTTCCAGC Ser Ala Leu Glu Glu Pro Lys Ala Thr Arg Leu 1135 1140	3643
TTCTGGCACT GAGTAAAGAT AATGGTGAGG GGCTTGGGGA GACAGCGAAA TGCAATCCCC	3703
CCCAAGCCCC TCATGTCATT CCCCCCTCCT CCACCCTACC AAGTAGTATT GTATTATTGT	3763
GGACTACTAA ATCTCTCTCC TCTCCTCCCT CCCCTCTCTC CCTTTCCTCC CTTCTTCTCC	3823
ACTCCCCAGC TCCCTCCTTC TCCTTCTCCT CCTTTGCCTC TCACTCTTCC TTGGAGCTGA	3883
GAGCAGAGAA AACTCAACC TCCTGACTGA AGCACTTTGG GTCACCACCA GGAGGCACCA	3943
TGCCGCCGCT CTAATACTTA GCTGCACTAT GTACAGATAT TTATACTTCA TATTTAAGAA	4003
AACAGATACT TTTGTCTACT CCCAATGATG GCTTGGGCCT TTCCTGTATA ATTCCTTGAT	4063
GAAAAATATT TATATAAAAT ACATTTTATT TTAATCAAAA AAAAAA	4110

6/23

Figur 2

GAGCGGACGG GCTCATGATG CCTCAGATCT GATCCGCATC TAACAGGCTG GCAATGAAGA	60
TACCCAGAGA ATAGTTCACA TCTATCATGC GTCACCTTCTA GACACAGCCA TCAGACGCAT	120
CTCCTCCCCT TTCTGCCTGA CCTTAGGACA CGTCCCACCG CCTCTCTTGA CGTCTGCCTG	180
GTCAACCATC ACTTCCTTAG AGAATAAGGA GAGAGGCGGA TGCAGGAAAT CATGCCACCG	240
ACGGGCCACC AGCCATGAGT GGGTGACGCT GAGCTGACGT CAAAGACAGA GAGGGCTGAA	300
GCCTTGTCAG CACCTGTCAC CCCGGCTCCT GCTCTCCGTG TAGCCTGAAG CCTGGATCCT	360
CCTGGTGAAA TCATCTTGGC CTGATAGCAT TGTGAGGTCT TCAGACAGGA CCCCTCGGAA	420
GCTAGTTACC ATG GAG GAT CAC ATG TTC GGT GTT CAG CAA ATC CAG CCC	469
Met Glu Asp His Met Phe Gly Val Gln Gln Ile Gln Pro	
1145 1150 1155	
AAT GTC ATT TCT GTT CGT CTC TTC AAG CGC AAA GTT GGG GGC CTG GGA	517
Asn Val Ile Ser Val Arg Leu Phe Lys Arg Lys Val Gly Gly Leu Gly	
1160 1165 1170	
TTT CTG GTG AAG GAG CGG GTC AGT AAG CCG CCC GTG ATC ATC TCT GAC	565
Phe Leu Val Lys Glu Arg Val Ser Lys Pro Pro Val Ile Ile Ser Asp	
1175 1180 1185	
CTG ATT CGT GGG GGC GCC GCA GAG CAG AGT GGC CTC ATC CAG GCC GGA	613
Leu Ile Arg Gly Gly Ala Ala Glu Gln Ser Gly Leu Ile Gln Ala Gly	
1190 1195 1200 1205	
GAC ATC ATT CTT GCG GTC AAC GGC CGG CCC TTG GTG GAC CTG AGC TAT	661
Asp Ile Ile Leu Ala Val Asn Gly Arg Pro Leu Val Asp Leu Ser Tyr	
1210 1215 1220	
GAC AGC GCC CTG GAG GTA CTC AGA GGC ATT GCC TCT GAG ACC CAC GTG	709
Asp Ser Ala Leu Glu Val Leu Arg Gly Ile Ala Ser Glu Thr His Val	
1225 1230 1235	
GTC CTC ATT CTG AGG GGC CCT GAA GGT TTC ACC ACG CAC CTG GAG ACC	757
Val Leu Ile Leu Arg Gly Pro Glu Gly Phe Thr Thr His Leu Glu Thr	
1240 1245 1250	
ACC TTT ACA GGT GAT GGG ACC CCC AAG ACC ATC CGG GTG ACA CAG CCC	805
Thr Phe Thr Gly Asp Gly Thr Pro Lys Thr Ile Arg Val Thr Gln Pro	
1255 1260 1265	
CTG GGT CCC CCC ACC AAA GCC GTG GAT CTG TCC CAC CAG CCA CCG GCC	853
Leu Gly Pro Pro Thr Lys Ala Val Asp Leu Ser His Gln Pro Pro Ala	
1270 1275 1280 1285	
GGC AAA GAA CAG CCC CTG GCA GTG GAT GGG GCC TCG GGT CCC GGG AAT	901
Gly Lys Glu Gln Pro Leu Ala Val Asp Gly Ala Ser Gly Pro Gly Asn	
1290 1295 1300	
GGG CCT CAG CAT GCC TAC GAT GAT GGG CAG GAG GCT GGC TCA CTC CCC	949
Gly Pro Gln His Ala Tyr Asp Asp Gly Gln Glu Ala Gly Ser Leu Pro	
1305 1310 1315	
CAT GCC AAC GGC TGG CCC CAG GCC CCC AGG CAG GAC CCC GCG AAG AAA	997
His Ala Asn Gly Trp Pro Gln Ala Pro Arg Gln Asp Pro Ala Lys Lys	
1320 1325 1330	

7/23

GCA ACC AGA GTC AGC CTC CAA GGC AGA GGG GAG AAC AAT GAA CTG CTC Ala Thr Arg Val Ser Leu Gln Gly Arg Gly Glu Asn Asn Glu Leu Leu 1335 1340 1345	1045
AAG GAG ATA GAG CCT GTG CTG AGC CTT CTC ACC AGT GGG AGC AGA GGG Lys Glu Ile Glu Pro Val Leu Ser Leu Leu Thr Ser Gly Ser Arg Gly 1350 1355 1360 1365	1093
GTC AAG GGA GGG GCA CCT GCC AAG GCA GAG ATG AAA GAT ATG GGA ATC Val Lys Gly Gly Ala Pro Ala Lys Ala Glu Met Lys Asp Met Gly Ile 1370 1375 1380	1141
CAG GTG GAC AGA GAT TTG GAC GGC AAG TCA CAC AAA CCT CTG CCC CTC Gln Val Asp Arg Asp Leu Asp Gly Lys Ser His Lys Pro Leu Pro Leu 1385 1390 1395	1189
GGC GTG GAG AAC GAC CGA GTC TTC AAT GAC CTA TGG GGG AAG GGC AAT Gly Val Glu Asn Asp Arg Val Phe Asn Asp Leu Trp Gly Lys Gly Asn 1400 1405 1410	1237
GTG CCT GTC GTC CTC AAC AAC CCA TAT TCA GAG AAG GAG CAG CCC CCC Val Pro Val Val Leu Asn Asn Pro Tyr Ser Glu Lys Glu Gln Pro Pro 1415 1420 1425	1285
ACC TCA GGA AAA CAG TCC CCC ACA AAG AAT GGC AGC CCC TCC AAG TGT Thr Ser Gly Lys Gln Ser Pro Thr Lys Asn Gly Ser Pro Ser Lys Cys 1430 1435 1440 1445	1333
CCA CGC TTC CTC AAG GTC AAG AAC TGG GAG ACT GAG GTG GTT CTC ACT Pro Arg Phe Leu Lys Val Lys Asn Trp Glu Thr Glu Val Val Leu Thr 1450 1455 1460	1381
GAC ACC CTC CAC CTT AAG AGC ACA TTG GAA ACG GGA TGC ACT GAG TAC Asp Thr Leu His Leu Lys Ser Thr Leu Glu Thr Gly Cys Thr Glu Tyr 1465 1470 1475	1429
ATC TGC ATG GGC TCC ATC ATG CAT CCT TCT CAG CAT GCA AGG AGG CCT Ile Cys Met Gly Ser Ile Met His Pro Ser Gln His Ala Arg Arg Pro 1480 1485 1490	1477
GAA GAC GTC CGC ACA AAA GGA CAG CTC TTC CCT CTC GCC AAA GAG TTT Glu Asp Val Arg Thr Lys Gly Gln Leu Phe Pro Leu Ala Lys Glu Phe 1495 1500 1505	1525
ATT GAT CAA TAC TAT TCA TCA ATT AAA AGA TTT GGC TCC AAA GCC CAC Ile Asp Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Phe Gly Ser Lys Ala His 1510 1515 1520 1525	1573
ATG GAA AGG CTG GAA GAG GTG AAC AAA GAG ATC GAC ACC ACT AGC ACT Met Glu Arg Leu Glu Glu Val Asn Lys Glu Ile Asp Thr Thr Ser Thr 1530 1535 1540	1621
TAC CAG CTC AAG GAC ACA GAG CTC ATC TAT GGG GCC AAG CAC GCC TGG Tyr Gln Leu Lys Asp Thr Glu Leu Ile Tyr Gly Ala Lys His Ala Trp 1545 1550 1555	1669
CGG AAT GCC TCG CGC TGT GTG GGC AGG ATC CAG TGG TCC AAG CTG CAG Arg Asn Ala Ser Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Ser Lys Leu Gln 1560 1565 1570	1717

8/23

GTA TTC GAT GCC CGT GAC TGC ACC ACG GCC CAC GGG ATG TTC AAC TAC Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Thr Thr Ala His Gly Met Phe Asn Tyr 1575 1580 1585	1765
ATC TGT AAC CAT GTC AAG TAT GCC ACC AAC AAA GGG AAC CTC AGG TCT Ile Cys Asn His Val Lys Tyr Ala Thr Asn Lys Gly Asn Leu Arg Ser 1590 1595 1600 1605	1813
GCC ATC ACC ATA TTC CCC CAG AGG ACA GAC GGC AAG CAC GAC TTC CGA Ala Ile Thr Ile Phe Pro Gln Arg Thr Asp Gly Lys His Asp Phe Arg 1610 1615 1620	1861
GTC TGG AAC TCC CAG CTC ATC CGC TAC GCT GGC TAC AAG CAC CGT GAC Val Trp Asn Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Ala Gly Tyr Lys His Arg Asp 1625 1630 1635	1909
GGC TCC ACC CTG GGG GAC CCA GCC AAT GTG CAG TTC ACA GAG ATA TGC Gly Ser Thr Leu Gly Asp Pro Ala Asn Val Gln Phe Thr Glu Ile Cys 1640 1645 1650	1957
ATA CAG CAG GGC TGG AAA CCG CCT AGA GGC CGC TTC GAT GTC CTG CCG Ile Gln Gln Gly Trp Lys Pro Pro Arg Gly Arg Phe Asp Val Leu Pro 1655 1660 1665	2005
CTC CTG CTT CAG GCC AAC GGC AAT GAC CCT GAG CTC TTC CAG ATT CCT Leu Leu Leu Gln Ala Asn Gly Asn Asp Pro Glu Leu Phe Gln Ile Pro 1670 1675 1680 1685	2053
CCA GAG CTG GTG TTG GAA CTT CCC ATC AGG CAC CCC AAG TTT GAG TGG Pro Glu Leu Val Leu Glu Leu Pro Ile Arg His Pro Lys Phe Glu Trp 1690 1695 1700	2101
TTC AAG GAC CTG GCG CTG AAG TGG TAC GGC CTC CCC GCC GTG TCC AAC Phe Lys Asp Leu Ala Leu Lys Trp Tyr Gly Leu Pro Ala Val Ser Asn 1705 1710 1715	2149
ATG CTC CTA GAG ATT GGC GGC CTG GAG TTC AGC GCC TGT CCC TTC AGT Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Ser Ala Cys Pro Phe Ser 1720 1725 1730	2197
GGC TGG TAC ATG GGC ACA GAG ATT GGT GTC CGC GAC TAC TGT GAC AAC Gly Trp Tyr Met Gly Thr Glu Ile Gly Val Arg Asp Tyr Cys Asp Asn 1735 1740 1745	2245
TCC CGC TAC AAT ATC CTG GAG GAA GTG GCC AAG AAG ATG AAC TTA GAC Ser Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Glu Val Ala Lys Lys Met Asn Leu Asp 1750 1755 1760 1765	2293
ATG AGG AAG ACG TCC TCC CTG TGG AAG GAC CAG GCG CTG GTG GAG ATC Met Arg Lys Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Gln Ala Leu Val Glu Ile 1770 1775 1780	2341
AAT ATC GCG GTT CTC TAT AGC TTC CAG AGT GAC AAA GTG ACC ATT GTT Asn Ile Ala Val Leu Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Lys Val Thr Ile Val 1785 1790 1795	2389
GAC CAT CAC TCC GCC ACC GAG TCC TTC ATT AAG CAC ATG GAG AAT GAG Asp His His Ser Ala Thr Glu Ser Phe Ile Lys His Met Glu Asn Glu 1800 1805 1810	2437

9/23

TAC CGC TGC CGG GGG GGC TGC CCT GCC GAC TGG GTG TGG ATC GTG CCC Tyr Arg Cys Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Val Trp Ile Val Pro 1815 1820 1825	2485
CCC ATG TCC GGA AGC ATC ACC CCT GTG TTC CAC CAG GAG ATG CTC AAC Pro Met Ser Gly Ser Ile Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met Leu Asn 1830 1835 1840 1845	2533
TAC CGG CTC ACC CCC TCC TTC GAA TAC CAG CCT GAT CCC TGG AAC ACG Tyr Arg Leu Thr Pro Ser Phe Glu Tyr Gln Pro Asp Pro Trp Asn Thr 1850 1855 1860	2581
CAT GTC TGG AAA GGC ACC AAC GGG ACC CCC ACA AAG CGG CGA GCC ATC His Val Trp Lys Gly Thr Asn Gly Thr Pro Thr Lys Arg Arg Ala Ile 1865 1870 1875	2629
GGC TTC AAG AAG CTA GCA GAA GCT GTC AAG TTC TCG GCC AAG CTG ATG Gly Phe Lys Lys Leu Ala Glu Ala Val Lys Phe Ser Ala Lys Leu Met 1880 1885 1890	2677
GGG CAG GCT ATG GCC AAG AGG GTG AAA GCG ACC ATC CTC TAT GCC ACA Gly Gln Ala Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Ala Thr 1895 1900 1905	2725
GAG ACA GGC AAA TCG CAA GCT TAT GCC AAG ACC TTG TGT GAG ATC TTC Glu Thr Gly Lys Ser Gln Ala Tyr Ala Lys Thr Leu Cys Glu Ile Phe 1910 1915 1920 1925	2773
AAA CAC GCC TTT GAT GCC AAG GTG ATG TCC ATG GAA GAA TAT GAC ATT Lys His Ala Phe Asp Ala Lys Val Met Ser Met Glu Glu Tyr Asp Ile 1930 1935 1940	2821
GTG CAC CTG GAA CAT GAA ACT CTG GTC CTT GTG GTC ACC AGC ACC TTT Val His Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe 1945 1950 1955	2869
GGC AAT GGA GAT CCC CCT GAG AAT GGG GAG AAA TTC GGC TGT GCT TTG Gly Asn Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Lys Phe Gly Cys Ala Leu 1960 1965 1970	2917
ATG GAA ATG AGG CAC CCC AAC TCT GTG CAG GAA GAA AGG AAG AGC TAC Met Glu Met Arg His Pro Asn Ser Val Gln Glu Glu Arg Lys Ser Tyr 1975 1980 1985	2965
AAG GTC CGA TTC AAC AGC GTC TCC TCC TAC TCT GAC TCC CAA AAA TCA Lys Val Arg Phe Asn Ser Val Ser Ser Tyr Ser Asp Ser Gln Lys Ser 1990 1995 2000 2005	3013
TCA GGC GAT GGG CCC GAC CTC AGA GAC AAC TTT GAG AGT GCT GGA CCC Ser Gly Asp Gly Pro Asp Leu Arg Asp Asn Phe Glu Ser Ala Gly Pro 2010 2015 2020	3061
CTG GCC AAT GTG AGG TTC TCA GTT TTT GGC CTC GGC TCA CGA GCA TAC Leu Ala Asn Val Arg Phe Ser Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala Tyr 2025 2030 2035	3109
CCT CAC TTT TGC GCC TTC GGA CAC GCT GTG GAC ACC CTC CTG GAA GAA Pro His Phe Cys Ala Phe Gly His Ala Val Asp Thr Leu Leu Glu Glu 2040 2045 2050	3157
CTG GGA GGG GAG AGG ATC CTG AAG ATG AGG GAA GGG GAT GAG CTC TGT Leu Gly Gly Glu Arg Ile Leu Lys Met Arg Glu Gly Asp Glu Leu Cys 2055 2060 2065	3205

10/23

GGG CAG GAA GAG GCT TTC AGG ACC TGG GCC AAG AAG GTC TTC AAG GCA Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Thr Trp Ala Lys Lys Val Phe Lys Ala 2070 2075 2080 2085	3253
GCC TGT GAT GTC TTC TGT GTG GGA GAT GAT GTC AAC ATT GAA AAG GCC Ala Cys Asp Val Phe Cys Val Gly Asp Asp Val Asn Ile Glu Lys Ala 2090 2095 2100	3301
AAC AAT TCC CTC ATC AGC AAT GAT CGC AGC TGG AAG AGA AAC AAG TTC Asn Asn Ser Leu Ile Ser Asn Asp Arg Ser Trp Lys Arg Asn Lys Phe 2105 2110 2115	3349
CGC CTC ACC TTT GTG GCC GAA GCT CCA GAA CTC ACA CAA GGT CTA TCC Arg Leu Thr Phe Val Ala Glu Ala Pro Glu Leu Thr Gln Gly Leu Ser 2120 2125 2130	3397
AAT GTC CAC AAA AAG CGA GTC TCA GCT GCC CGG CTC CTT AGC CGT CAA Asn Val His Lys Lys Arg Val Ser Ala Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gln 2135 2140 2145	3445
AAC CTC CAG AGC CCT AAA TCC AGT CGG TCA ACT ATC TTC GTG CGT CTC Asn Leu Gln Ser Pro Lys Ser Ser Arg Ser Thr Ile Phe Val Arg Leu 2150 2155 2160 2165	3493
CAC ACC AAC GGG AGC CAG GAG CTG CAG TAC CAG CCT GGG GAC CAC CTG His Thr Asn Gly Ser Gln Glu Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His Leu 2170 2175 2180	3541
GGT GTC TTC CCT GGC AAC CAC GAG GAC CTC GTG AAT GCC CTG ATC GAG Gly Val Phe Pro Gly Asn His Glu Asp Leu Val Asn Ala Leu Ile Glu 2185 2190 2195	3589
CGG CTG GAG GAC GCG CCG CCT GTC AAC CAG ATG GTG AAA GTG GAA CTG Arg Leu Glu Asp Ala Pro Pro Val Asn Gln Met Val Lys Val Glu Leu 2200 2205 2210	3637
CTG GAG GAG CGG AAC ACG GCT TTA GGT GTC ATC AGT AAC TGG ACA GAC Leu Glu Glu Arg Asn Thr Ala Leu Gly Val Ile Ser Asn Trp Thr Asp 2215 2220 2225	3685
GAG CTC CGC CTC CCG CCC TGC ACC ATC TTC CAG GCC TTC AAG TAC TAC Glu Leu Arg Leu Pro Pro Cys Thr Ile Phe Gln Ala Phe Lys Tyr Tyr 2230 2235 2240 2245	3733
CTG GAC ATC ACC ACG CCA CCA ACG CCT CTG CAG CTG CAG CAG TTT GCC Leu Asp Ile Thr Thr Pro Pro Thr Pro Leu Gln Leu Gln Gln Phe Ala 2250 2255 2260	3781
TCC CTA GCT ACC AGC GAG AAG GAG AAG CAG CGT CTG CTG GTC CTC AGC Ser Leu Ala Thr Ser Glu Lys Glu Lys Gln Arg Leu Leu Val Leu Ser 2265 2270 2275	3829
AAG GGT TTG CAG GAG TAC GAG GAA TGG AAA TGG GGC AAG AAC CCC ACC Lys Gly Leu Gln Glu Tyr Glu Glu Trp Lys Trp Gly Lys Asn Pro Thr 2280 2285 2290	3877
ATC GTG GAG GTG CTG GAG GAG TTC CCA TCT ATC CAG ATG CCG GCC ACC Ile Val Glu Val Leu Glu Glu Phe Pro Ser Ile Gln Met Pro Ala Thr 2295 2300 2305	3925

11/23

CTG CTC CTG ACC CAG CTG TCC CTG CTG CAG CCC CGC TAC TAT TCC ATC Leu Leu Leu Thr Gln Leu Ser Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile 2310 2315 2320 2325	3973
AGC TCC TCC CCA GAC ATG TAC CCT GAT GAA GTG CAC CTC ACT GTG GCC Ser Ser Ser Pro Asp Met Tyr Pro Asp Glu Val His Leu Thr Val Ala 2330 2335 2340	4021
ATC GTT TCC TAC CGC ACT CGA GAT GGA GAA GGA CCA ATT CAC CAC GGC Ile Val Ser Tyr Arg Thr Arg Asp Gly Glu Gly Pro Ile His His Gly 2345 2350 2355	4069
GTA TGC TCC TCC TGG CTC AAC CGG ATA CAG GCT GAC GAA CTG GTC CCC Val Cys Ser Ser Trp Leu Asn Arg Ile Gln Ala Asp Glu Leu Val Pro 2360 2365 2370	4117
TGT TTC GTG AGA GGA GCA CCC AGC TTC CAC CTG CCC CGG AAC CCC CAA Cys Phe Val Arg Gly Ala Pro Ser Phe His Leu Pro Arg Asn Pro Gln 2375 2380 2385	4165
GTC CCC TGC ATC CTC GTT GGA CCA GGC ACC GGC ATT GCC CCT TTC CGA Val Pro Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg 2390 2395 2400 2405	4213
AGC TTC TGG CAA CAG CGG CAA TTT GAT ATC CAA CAC AAA GGA ATG AAC Ser Phe Trp Gln Gln Arg Gln Phe Asp Ile Gln His Lys Gly Met Asn 2410 2415 2420	4261
CCC TGC CCC ATG GTC CTG GTC TTC GGG TGC CGG CAA TCC AAG ATA GAT Pro Cys Pro Met Val Leu Val Phe Gly Cys Arg Gln Ser Lys Ile Asp 2425 2430 2435	4309
CAT ATC TAC AGG GAA GAG ACC CTG CAG GCC AAG AAC AAG GGG GTC TTC His Ile Tyr Arg Glu Glu Thr Leu Gln Ala Lys Asn Lys Gly Val Phe 2440 2445 2450	4357
AGA GAG CTG TAC ACG GCT TAC TCC CGG GAG CCA GAC AAA CCA AAG AAG Arg Glu Leu Tyr Thr Ala Tyr Ser Arg Glu Pro Asp Lys Pro Lys Lys 2455 2460 2465	4405
TAC GTG CAG GAC ATC CTG CAG GAG CAG CTG GCG GAG TCT GTG TAC CGA Tyr Val Gln Asp Ile Leu Gln Glu Gln Leu Ala Glu Ser Val Tyr Arg 2470 2475 2480 2485	4453
GCC CTG AAG GAG CAA GGG GGC CAC ATA TAC GTC TGT GGG GAC GTC ACC Ala Leu Lys Glu Gln Gly Gly His Ile Tyr Val Cys Gly Asp Val Thr 2490 2495 2500	4501
ATG GCT GCT GAT GTC CTC AAA GCC ATC CAG CGC ATC ATG ACC CAG CAG Met Ala Ala Asp Val Leu Lys Ala Ile Gln Arg Ile Met Thr Gln Gln 2505 2510 2515	4549
GGG AAG CTC TCG GCA GAG GAC GCC GGC GTA TTC ATC AGC CGG ATG AGG Gly Lys Leu Ser Ala Glu Asp Ala Gly Val Phe Ile Ser Arg Met Arg 2520 2525 2530	4597
GAT GAC AAC CGA TAC CAT GAG GAT ATT TTT GGA GTC ACC CTG CGA ACG Asp Asp Asn Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Val Thr Leu Arg Thr 2535 2540 2545	4645
ATC GAA GTG ACC AAC CGC CTT AGA TCT GAG TCC ATT GCC TTC ATT GAA Ile Glu Val Thr Asn Arg Leu Arg Ser Glu Ser Ile Ala Phe Ile Glu 2550 2555 2560 2565	4693

WO 95/27070

PCT/EP95/01202

12/23

GAG AGC AAA AAA GAC ACC GAT GAG GTT TTC AGC TCC TAACTGGACC
Glu Ser Lys Lys Asp Thr Asp Glu Val Phe Ser Ser
2570 2575

4739

CTCTTGCCCA GCCGGCTGCA AGTTTGTAAG CGCGGGACAG A

4780

Figur 3

GAATTCGGCA CGAGGAGCCA CAGAGCAGAC GGAGGCCGCC CGTCCGGCCC CAGCGAC	57
ATG GGC AAC TTG AAG AGT GTG GGC CAG GAG CCC GGG CCC CCC TGC GGC Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Gly Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly 1435 1440 1445	105
CTG GGG CTG GGG CTG GGC CTC GGG CTA TGC GGC AAG CAG GGC CCA GCC Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala 1450 1455 1460 1465	153
TCC CCG GCA CCT GAG CCC AGC CGG GCC CCC GCA CCC GCC ACC CCG CAC Ser Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Pro Ala Thr Pro His 1470 1475 1480	201
GCG CCA GAC CAC AGC CCA GCT CCC AAC AGC CCC ACG CTG ACC CGG CCT Ala Pro Asp His Ser Pro Ala Pro Asn Ser Pro Thr Leu Thr Arg Pro 1485 1490 1495	249
CCG GAG GGG CCC AAG TTC CCT CGC GTG AAG AAC TGG GAG CTG GGG AGC Pro Glu Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Leu Gly Ser 1500 1505 1510	297
ATC ACC TAC GAC ACT CTG TGC GCG CAG TCC CAA CAG GAC GGG CCC TGC Ile Thr Tyr Asp Thr Leu Cys Ala Gln Ser Gln Gln Asp Gly Pro Cys 1515 1520 1525	345
ACT CCC AGG CGC TGC CTG GGC TCC CTG GTG TTG CCC CGG AAA CTG CAG Thr Pro Arg Arg Cys Leu Gly Ser Leu Val Leu Pro Arg Lys Leu Gln 1530 1535 1540 1545	393
ACC CGG CCC TCC CCG GGA CCT CCA CCC GCT GAG CAG CTG CTG AGC CAG Thr Arg Pro Ser Pro Gly Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Leu Ser Gln 1550 1555 1560	441
GCC AGG GAC TTC ATC AAC CAG TAC TAC AGC TCC ATC AAG AGG AGC GGC Ala Arg Asp Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser Gly 1565 1570 1575	489
TCC CAG GCT CAC GAG GAG CGG CTT CAG GAG GTG GAG GCC GAG GTG GCA Ser Gln Ala His Glu Glu Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala 1580 1585 1590	537
TCC ACG GGC ACC ATC CAC CTC CGA GAG AGT GAG CTG GTG TTC GGG GCC Ser Thr Gly Thr Ile His Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala 1595 1600 1605	585
AAG CAG GCC TGG CGC AAT GCA CCC CGC TGC GTG GGC CGC ATC CAG TGG Lys Gln Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp 1610 1615 1620 1625	633
GGG AAG CTG CAG GTG TTT GAT GCC CGG GAC TGC AGC TCA GCA CAG GAG Gly Lys Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Ser Ser Ala Gln Glu 1630 1635 1640	681
ATG TTC ACC TAC ATC TGC AAC CAC ATC AAG TAC GCC ACC AAC CGC GGC Met Phe Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly 1645 1650 1655	729
AAC CTT CGC TCG GCC ATC ACA GTG TTC CCG CAG CGC GCC CCG GGC CGC Asn Leu Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Ala Pro Gly Arg 1660 1665 1670	777

14/23

GGA GAC TTC CGG ATC TGG AAC AGC CAG CTG GTG CGC TAC GCA GGC TAC Gly Asp Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr 1675 1680 1685	825
AGA CAG CAG GAT GGC TCT GTG CGT GGG GAC CCA GCC AAC GTG GAG ATC Arg Gln Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile 1690 1695 1700 1705	873
ACG GAG CTC TGC ATC CAG CAC GGC TGG ACC CCC GGA AAC GGC CGC TTC Thr Glu Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe 1710 1715 1720	921
GAC GTG CTG CCC CTG CTG CTC CAG GCC CCA GAC GAG GCT CCA GAG CTC Asp Val Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu Ala Pro Glu Leu 1725 1730 1735	969
TTT GTT CTG CCC CCC GAG CTG GTC CTT GAA GTG CCC CTA GGA GCA CCC Phe Val Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Gly Ala Pro 1740 1745 1750	1017
CAC ACT GGA GTG GTT CGC GGC CCT GGG CTG CGA TGG TAT GCC CTC CCG His Thr Gly Val Val Arg Gly Pro Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro 1755 1760 1765	1065
GCC GTG TCC AAC ATG CTG CTG GAA ATC GGG GGT CTG GAG TTC TCC GCG Ala Val Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Ser Ala 1770 1775 1780 1785	1113
GCC CCC TTC AGC GGC TGG TAC ATG AGC ACG GAG ATT GGC ACG CCG AAC Ala Pro Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn 1790 1795 1800	1161
CTG TGT GAC CCT CAC CGC TAC AAT ATC CTG GAG GAT GTG GCC GTC TGC Leu Cys Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys 1805 1810 1815	1209
ATG GAC CTC GAC ACG CGG ACC ACC TCG TCC CTG TGG AAG GAC AAG GCG Met Asp Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala 1820 1825 1830	1257
GCC GTG GAG ATC AAC CTG GCT GTG CTG CAC AGC TTT CAG CTC GCC AAG Ala Val Glu Ile Asn Leu Ala Val Leu His Ser Phe Gln Leu Ala Lys 1835 1840 1845	1305
GTG ACC ATC GTG GAC CAC CAC GCC GCC ACG GTG TCC TTC ATG AAG CAC Val Thr Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Val Ser Phe Met Lys His 1850 1855 1860 1865	1353
CTG GAC AAC GAG CAG AAG GCC AGG GGG GGC TGC CCC GCC GAC TGG GCC Leu Asp Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala 1870 1875 1880	1401
TGG ATC GTG CCC CCC ATC TAC GGC AGC CTA CCG CCC GTC TTC CAC CAG Trp Ile Val Pro Pro Ile Tyr Gly Ser Leu Pro Pro Val Phe His Gln 1885 1890 1895	1449
GAG ATG GTC AAC TAC ATC CTG TCC CCT GCC TTC CGC TAC CAG CCA GAC Glu Met Val Asn Tyr Ile Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp 1900 1905 1910	1497

CCC TGG AAA GGG AGC GCG ACC AAG GGC GCC GGC ATC ACC AGG AAG AAG Pro Trp Lys Gly Ser Ala Thr Lys Gly Ala Gly Ile Thr Arg Lys Lys 1915 1920 1925	1545
ACC TTT AAG GAA GTG GCC AAC GCG GTG AAG ATC TCT GCC TCA CTC ATG Thr Phe Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met 1930 1935 1940 1945	1593
GGC ACC CTG ATG GCC AAG CGA GTG AAA GCA ACC ATC CTG TAC GCC TCT Gly Thr Leu Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Ala Ser 1950 1955 1960	1641
GAG ACC GGC CGG GCC CAG AGC TAC GCT CAG CAG CTG GGG AGG CTC TTC Glu Thr Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe 1965 1970 1975	1689
CGG AAG GCC TTC GAT CCC CGG GTC CTG TGC ATG GAT GAG TAT GAC GTG Arg Lys Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val 1980 1985 1990	1737
GTG TCC CTG GAG CAC GAG GCA CTG GTG CTG GTG GTG ACC AGC ACC TTT Val Ser Leu Glu His Glu Ala Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe 1995 2000 2005	1785
GGG AAT GGC GAT CCC CCG GAG AAT GGA GAG AGT TTT GCA GCT GCC CTG Gly Asn Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu 2010 2015 2020 2025	1833
ATG GAG ATG TCG GGG CCC TAC AAC AGC TCC CCA CGG CCG GAA CAG CAC Met Glu Met Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His 2030 2035 2040	1881
AAG AGT TAC AAG ATC CGC TTC AAC AGC GTC TCC TGC TCA GAC CCG CTG Lys Ser Tyr Lys Ile Arg Phe Asn Ser Val Ser Cys Ser Asp Pro Leu 2045 2050 2055	1929
GTG TCC TCC TGG CGG CGG AAG AGA AAG GAG TCC AGC AAC ACA GAC AGC Val Ser Ser Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser 2060 2065 2070	1977
GCG GGG GCC CTG GGG ACC CTC AGG TTC TGT GTG TTC GGA CTG GGC TCC Ala Gly Ala Leu Gly Thr Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu Gly Ser 2075 2080 2085	2025
CGG GCG TAC CCC CAC TTC TGC GCC TTC GCG CGA GCG GTG GAC ACC CGG Arg Ala Tyr Pro His Phe Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg 2090 2095 2100 2105	2073
CTG GAA GAG CTT GGA GGG GAG CGG CTG CTG CAG CTG GGC CAG GGC GAT Leu Glu Glu Leu Gly Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp 2110 2115 2120	2121
GAG CTC TGC GGC CAG GAA GAG GCC TTC CGT GGT TGG GCA AAG GCG GCA Glu Leu Cys Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Lys Ala Ala 2125 2130 2135	2169
TTC CAG GCC TCC TGC GAG ACG TTC TGC GTT GGG GAG GAG GCC AAG GCT Phe Gln Ala Ser Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Glu Ala Lys Ala 2140 2145 2150	2217
GCT GCC CAG GAC ATC TTC AGC CCC AAA CGG AGC TGG AAA CGC CAG AGG Ala Ala Gln Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg 2155 2160 2165	2265

16/23

TAC CGG CTG AGC GCC CAG GCC GAG GGC CTC CAG CTG CTG CCA GGC CTG Tyr Arg Leu Ser Ala Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu 2170 2175 2180 2185	2313
ATC CAC GTG CAC AGA CGG AAG ATG TTT CAG GCC ACA GTC CTC TCG GTG Ile His Val His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Val Leu Ser Val 2190 2195 2200	2361
GAA AAT CTG CAA AGC AGC AAG TCC ACC CGG GCC ACC ATC CTG GTG CGC Glu Asn Leu Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu Val Arg 2205 2210 2215	2409
CTG GAC ACT GCA GGC CAG GAG GGG CTG CAG TAC CAG CCG GGG GAC CAC Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His 2220 2225 2230	2457
ATA GGC ATC TCC GCG CCC AAC CGG CCG GGC CTG GTG GAG GCG CTG CTG Ile Gly Ile Ser Ala Pro Asn Arg Pro Gly Leu Val Glu Ala Leu Leu 2235 2240 2245	2505
AGC CGC GTG GAG GAC CCG CCA CCG CCC ACC GAG TCT GTG GCT GTG GAG Ser Arg Val Glu Asp Pro Pro Pro Pro Thr Glu Ser Val Ala Val Glu 2250 2255 2260 2265	2553
CAG CTG GAG AAA GGC AGC CCA GGC GGC CCT CCT CCC AGC TGG GTG CGG Gln Leu Glu Lys Gly Ser Pro Gly Gly Pro Pro Pro Ser Trp Val Arg 2270 2275 2280	2601
GAC CCA CGG CTG CCC CCG TGC ACC GTG CGC CAG GCT CTC ACC TTC TTC Asp Pro Arg Leu Pro Pro Cys Thr Val Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe 2285 2290 2295	2649
CTG GAC ATC ACC TCC CCA CCC AGC CCC CGG CTT CTC CGA CTG CTC AGC Leu Asp Ile Thr Ser Pro Pro Ser Pro Arg Leu Leu Arg Leu Leu Ser 2300 2305 2310	2697
ACC CTG GCC GAA GAA CCC AGC GAG CAG CAG GAG CTT GAG ACC CTC AGT Thr Leu Ala Glu Glu Pro Ser Glu Gln Gln Glu Leu Glu Thr Leu Ser 2315 2320 2325	2745
CAG GAC CCC CGG CGC TAC GAG GAG TGG AAG TTG GTC CGC TGC CCC ACG Gln Asp Pro Arg Arg Tyr Glu Glu Trp Lys Leu Val Arg Cys Pro Thr 2330 2335 2340 2345	2793
CTG CTG GAG GTG CTG GAG CAG TTC CCG TCC GTG GCG CTG CCC GCC CCG Leu Leu Glu Val Leu Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro 2350 2355 2360	2841
CTG CTC CTC ACC CAG CTG CCC CTG CTG CAG CCC CGG TAC TAC TCT GTC Leu Leu Leu Thr Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val 2365 2370 2375	2889
AGC TCG GCC CCC AAC GCC CAC CCC GGA GAG GTC CAC CTC ACA GTG GCC Ser Ser Ala Pro Asn Ala His Pro Gly Glu Val His Leu Thr Val Ala 2380 2385 2390	2937
GTG CTG GCG TAC AGG ACC CAA GAT GGG CTG GGC CCC CTA CAC TAC GGG Val Leu Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr Gly 2395 2400 2405	2985

GTC TGC TCC ACA TGG CTG AGC CAG CTC AAG ACT GGA GAC CCC GTG CCC Val Cys Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Thr Gly Asp Pro Val Pro 2410 2415 2420 2425	3033
TGC TTC ATC AGG GGG GCT CCC TCC TTC CGG CTG CCG CCT GAC CCC TAC Cys Phe Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro Tyr 2430 2435 2440	3081
GTG CCC TGC ATC CTC GTG GGC CCT GGC ACT GGC ATC GCC CCC TTC CGG Val Pro Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg 2445 2450 2455	3129
GGA TTT TGG CAG GAG AGG CTG CAT GAC ATT GAG AGC AAA GGG CTG CAG Gly Phe Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys Gly Leu Gln 2460 2465 2470	3177
CCG CAC CCC ATG ACC CTG GTG TTC GGC TGC CGC TGC TCC CAA CTC GAC Pro His Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys Ser Gln Leu Asp 2475 2480 2485	3225
CAT CTC TAC CGC GAC GAG GTG CAG GAC GCC CAG GAG CGC GGG GTG TTT His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asp Ala Gln Glu Arg Gly Val Phe 2490 2495 2500 2505	3273
GGC CGC GTC CTC ACC GCC TTC TCC CGG GAA CCT GAC AGC CCC AAG ACC Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu Pro Asp Ser Pro Lys Thr 2510 2515 2520	3321
TAC GTA CAG GAC ATC CTG AGA ACC GAG CTG GCT GCC GAG GTG CAC CGC Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu Leu Ala Ala Glu Val His Arg 2525 2530 2535	3369
GTG CTG TGC CTC GAG CGG GGC CAC ATG TTT GTC TGC GGC GAT GTC ACT Val Leu Cys Leu Glu Arg Gly His Met Phe Val Cys Gly Asp Val Thr 2540 2545 2550	3417
ATG GCA ACC AGC GTC CTG CAG ACG GTG CAG CGC ATC TTG GCG ACA GAG Met Ala Thr Ser Val Leu Gln Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu 2555 2560 2565	3465
GGC GAC ATG GAG CTG GAC GAG GCG GGC GAC GTC ATC GGC GTG CTG CGG Gly Asp Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg 2570 2575 2580 2585	3513
GAT CAG CAA CGC TAT CAC GAG GAC ATT TTC GGC CTC ACG CTG CGC ACC Asp Gln Gln Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr 2590 2595 2600	3561
CAG GAG GTG ACA AGC CGT ATA CGT ACC CAG AGC TTT TCC CTG CAG GAG Gln Glu Val Thr Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu 2605 2610 2615	3609
CGG CAT CTG CGG GGC GCG GTG CCC TGG GCC TTC GAC CCG CCC GGC CCA Arg His Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Pro 2620 2625 2630	3657
GAC ACC CCC GGC CCC TGAGACCCCT CTTGCTTCCC ACTGCAGTTC CCGGAGAGAG Asp Thr Pro Gly Pro 2635	3712
GGGCTGTCAT TCCAATATGG CTCTACCGCT GTCCTGTTGG CCTTTACCGG GACCGGCCAC	3772
CTCTCCCTCC CCTCCCAAGG TGACTTCCCA GAGACTGTTG GATTCCCTGT ACTATCTCAT	3832

18/23

CCTCTCATCT CTAGGTCTGT TTCCCCACCC TAAGTCCATC TGGAAGACCC CTCCCAGCAG	3892
CGGTATTCCA GAGCCTACAG TCAGCCCTTT GGTGTTTAGG TGAATTTTAG ATTCCCCTCG	3952
CCTCTCTCCC GGGAAGTATC TTATCTTGAA ACCTGATCTC TAAATCATTG AAATATTTAT	4012
TATTGAAGAT TTACCATAAG AGACTGGACC AGAAGTTAGG AGACCTACTA AGATGCCTAA	4072
GCCAAGGTCC TCCGGGGCCG AATTC	4097

Fig. 4a

pSP65h - CMV1

-(2166 bps)

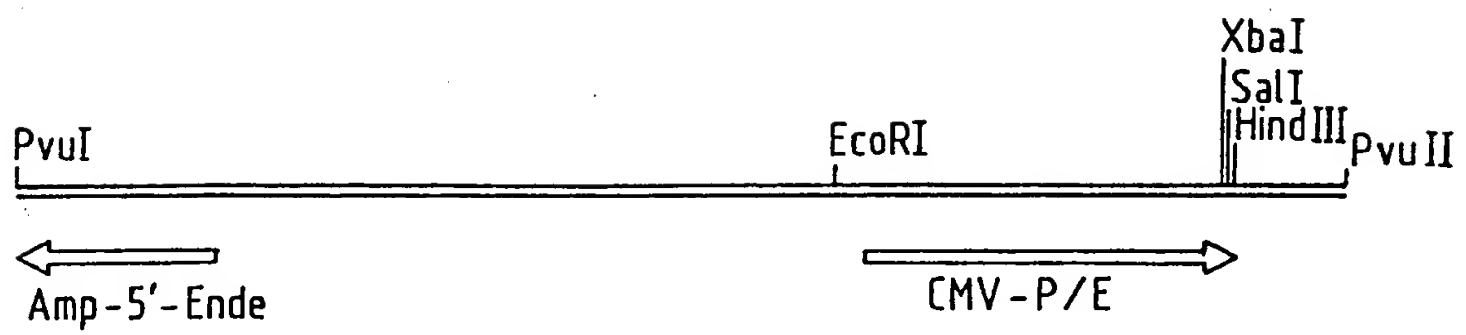


Fig. 4b

PSCT GALX-556

(2802 bps)

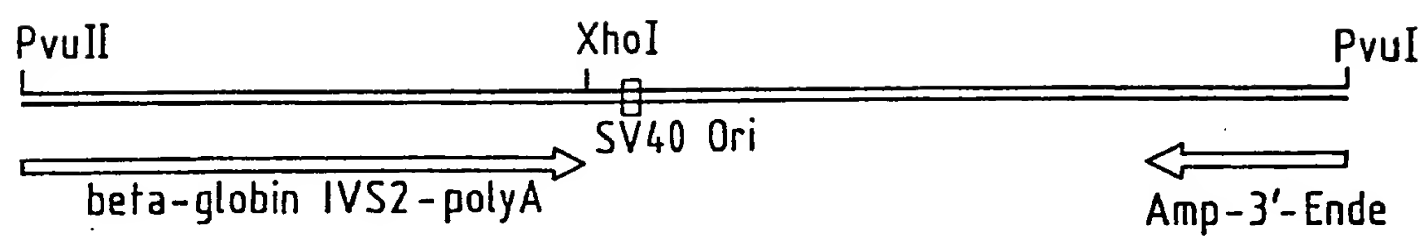
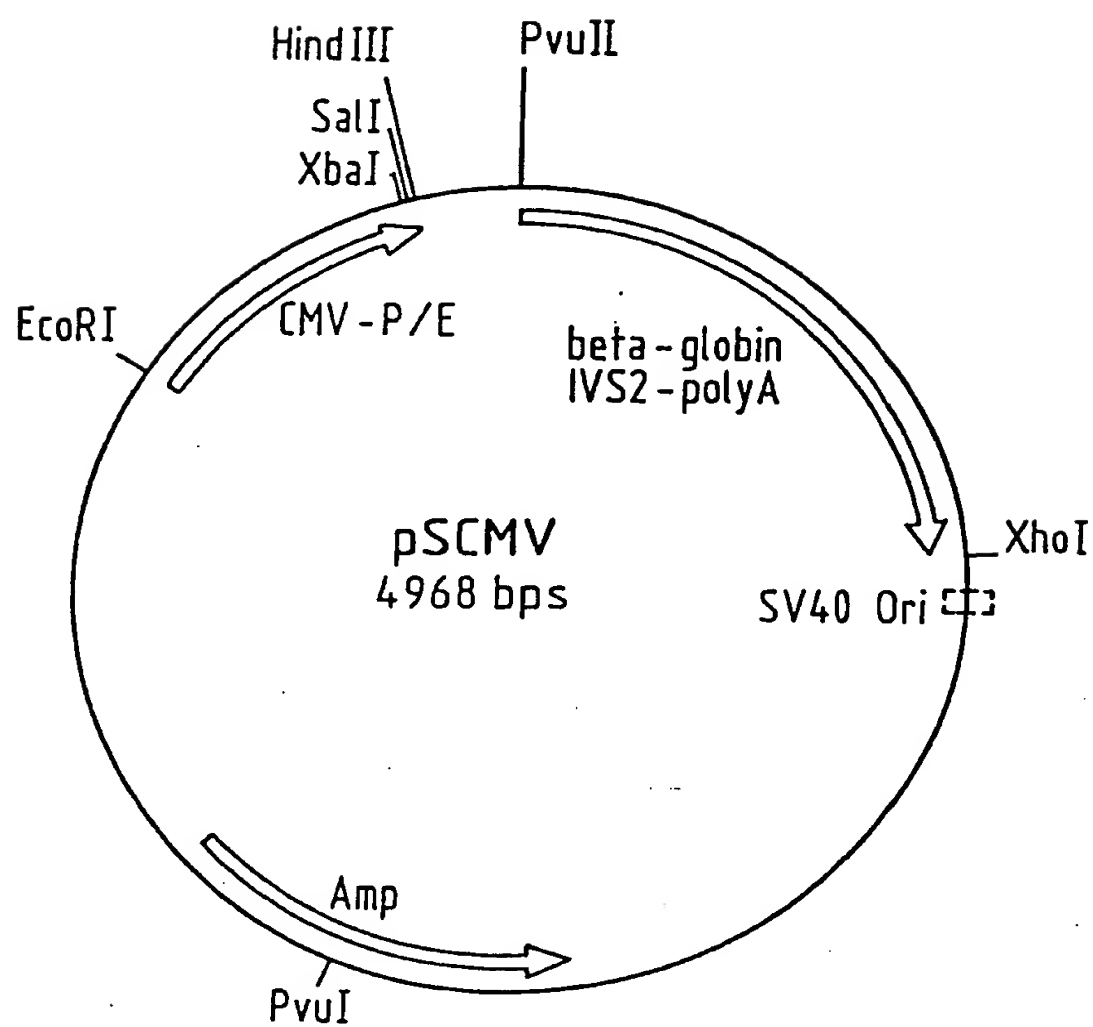


Fig. 4c



22/23

Fig. 4 d

iNOS - (3970 bps)

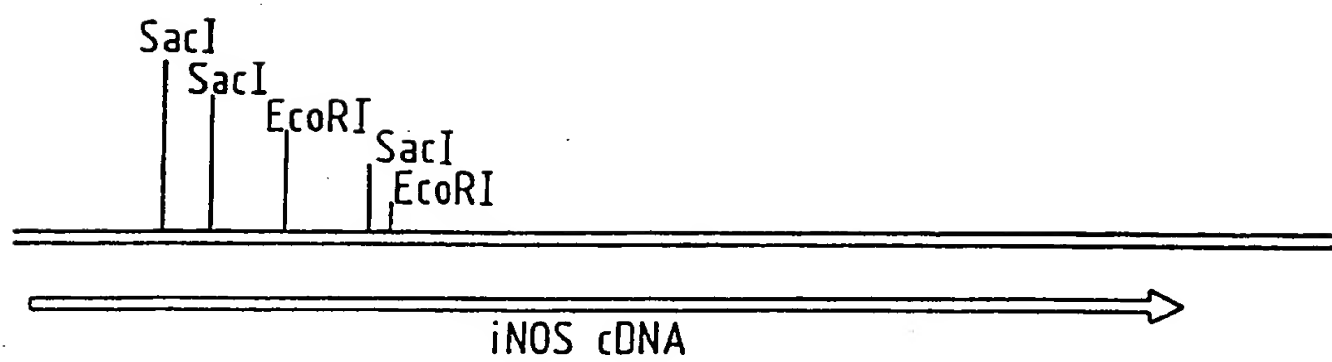
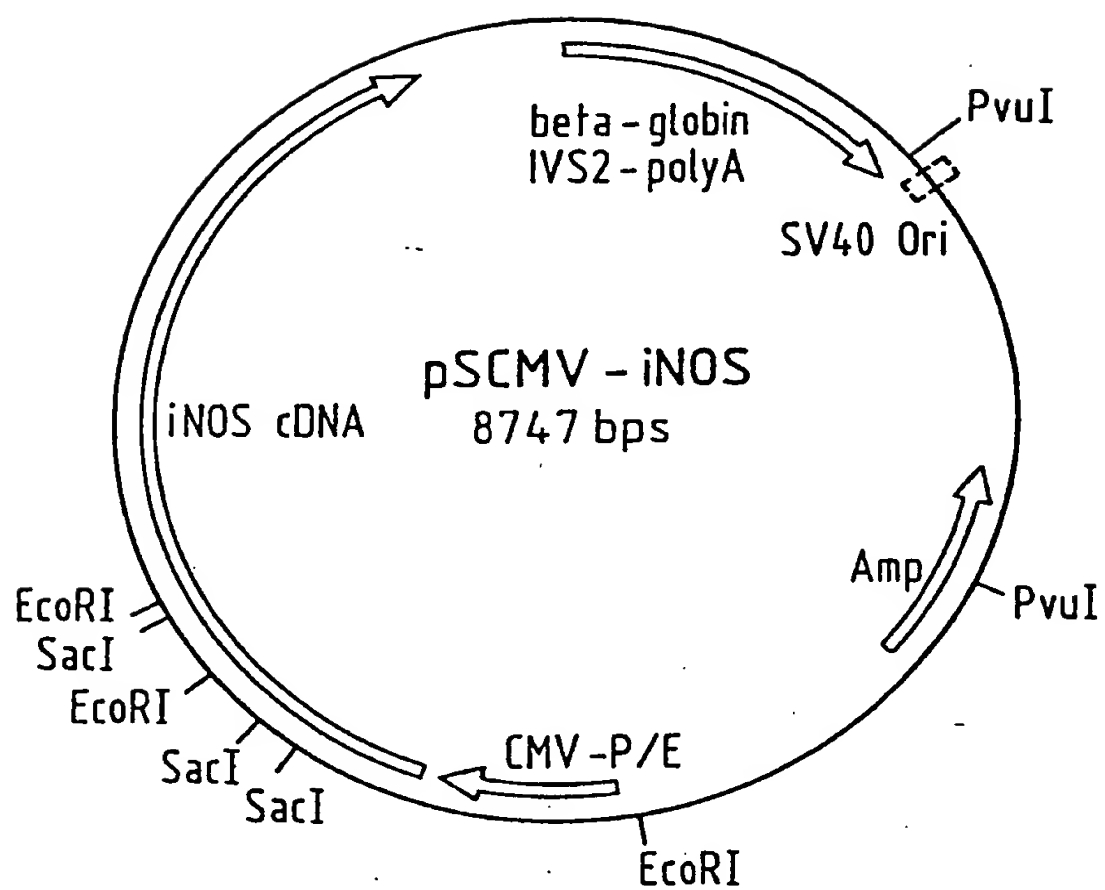


Fig. 4e



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/01202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C12N9/00 C07K14/00 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO-A-94 24269 (NOVO NORDISK A/S) 27 October 1994 see the whole document ---	1-4, 6, 10
X	FEBS LETTERS, vol. 316, no. 2, January 1993 pages 175-180, M. NAKANE ET AL. 'Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle' see the whole document ---	1-7, 10
Y	---	8
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 September 1995

Date of mailing of the international search report

19.09.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Donath, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Publication No
PCT/EP 95/01202

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, vol. 89, August 1992 pages 6711-6715, C.J. LOWENSTEIN ET AL. 'Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme'	1-7,10
Y	see the whole document ---	8
X	J.BIOL.CHEM., vol. 267, no. 21, July 1992 pages 14519-14522, S.P. JANSSENS ET AL. 'Cloning and Expression of a cDNA Encoding Human Endothelium-derived Relaxing Factor/Nitric Oxide synthase'	1-4,6,10
Y	see the whole document ---	5
X	BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN., vol. 196, no. 3, November 1993 pages 1481-1489, I.G. CHARLES ET AL. 'Cloning and Expression of a Rat Neuronal Nitric Oxide Synthase Coding Sequence in a Baculovirus/Insect Cell System'	1-4,6,10
Y	see the whole document ---	5
Y	JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 1A, no. 484A, February 1994 page 235a L.J. FELDMAN ET AL. 'Site specificity of adenovirus-mediated gene transfer by hydrogel-coated balloon. A histochemical and PCR analysis. Abstract No: 906-34'	10-12
Y	see the whole document ---	
Y	CIRCULATION, vol. 88, no. 4(2), October 1993 page I-660 P.G. STEG ET AL. 'Local Delivery of Adenovirus for percutaneous Arterial Gene Transfer. A Comparison of Double and Hydrogel-Coated Balloons. Abstract No: 3554'	10-12
Y	see the whole document ---	
Y	ARCHIVES OF SURGERY, vol. 128, November 1993 pages 1212-1220, D.A. GELLER ET AL. 'Should Surgeons Clone Genes?'	10-12
	see page 1218, right column, line 9 - page 1219, left column, line 19 see page 1215, left column, line 4 - right column, line 25 ---	
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 95/01202

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EMBL MAMMALIAN Accession no. M95674, 24 June 1992 see abstract & W.C. Sessa et al. 'Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase' (Unpublished)</p> <p>-----</p>	5

Information on patent family members

PCT/EP 95/01202

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Patentsymbol
PCT/EP 95/01202

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/86 C12N9/00 C07K14/00 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	WO-A-94 24269 (NOVO NORDISK A/S) 27. Oktober 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-4, 6, 10
X	FEBS LETTERS, Bd. 316, Nr. 2, Januar 1993 Seiten 175-180, M. NAKANE ET AL. 'Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle' siehe das ganze Dokument ---	1-7, 10
Y	---	8
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. September 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19.09.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Donath, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, Bd. 89, August 1992 Seiten 6711-6715, C.J. LOWENSTEIN ET AL. 'Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme' siehe das ganze Dokument ---	1-7,10
Y		8
X	J.BIOL.CHEM., Bd. 267, Nr. 21, Juli 1992 Seiten 14519-14522, S.P. JANSSENS ET AL. 'Cloning and Expression of a cDNA Encoding Human Endothelium-derived Relaxing Factor/Nitric Oxide synthase' siehe das ganze Dokument ---	1-4,6,10
Y		5
X	BIOCHEM.BIOPHYS.RES.COMMUN., Bd. 196, Nr. 3, November 1993 Seiten 1481-1489, I.G. CHARLES ET AL. 'Cloning and Expression of a Rat Neuronal Nitric Oxide Synthase Coding Sequence in a Baculovirus/Insect Cell System' siehe das ganze Dokument ---	1-4,6,10
Y		5
Y	JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, Bd. 1A, Nr. 484A, Februar 1994 Seite 235a L.J. FELDMAN ET AL. 'Site specificity of adenovirus-mediated gene transfer by hydrogel-coated balloon. A histochemical and PCR analysis. Abstract No: 906-34' siehe das ganze Dokument ---	10-12
Y	CIRCULATION, Bd. 88, Nr. 4(2), Oktober 1993 Seite I-660 P.G. STEG ET AL. 'Local Delivery of Adenovirus for percutaneous Arterial Gene Transfer. A Comparison of Double and Hydrogel-Coated Balloons. Abstract No: 3554' siehe das ganze Dokument ---	10-12
Y	ARCHIVES OF SURGERY, Bd. 128, November 1993 Seiten 1212-1220, D.A. GELLER ET AL. 'Should Surgeons Clone Genes?' siehe Seite 1218, rechte Spalte, Zeile 9 - Seite 1219, linke Spalte, Zeile 19 siehe Seite 1215, linke Spalte, Zeile 4 - rechte Spalte, Zeile 25 ---	10-12

	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE EMBL MAMMALIAN Accession no. M95674, 24.Juni 1992 siehe Zusammenfassung & W.C. Sessa et al. 'Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase' (Unpublished)</p> <p>-----</p>	5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Patentsymbol
PCT/EP 95/01202

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9424269	27-10-94	KEINE	